

EJU



FR 00 / 1318

REC'D 13 JUN 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 21 JUL 2000

WIPO

PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 MAI 2000

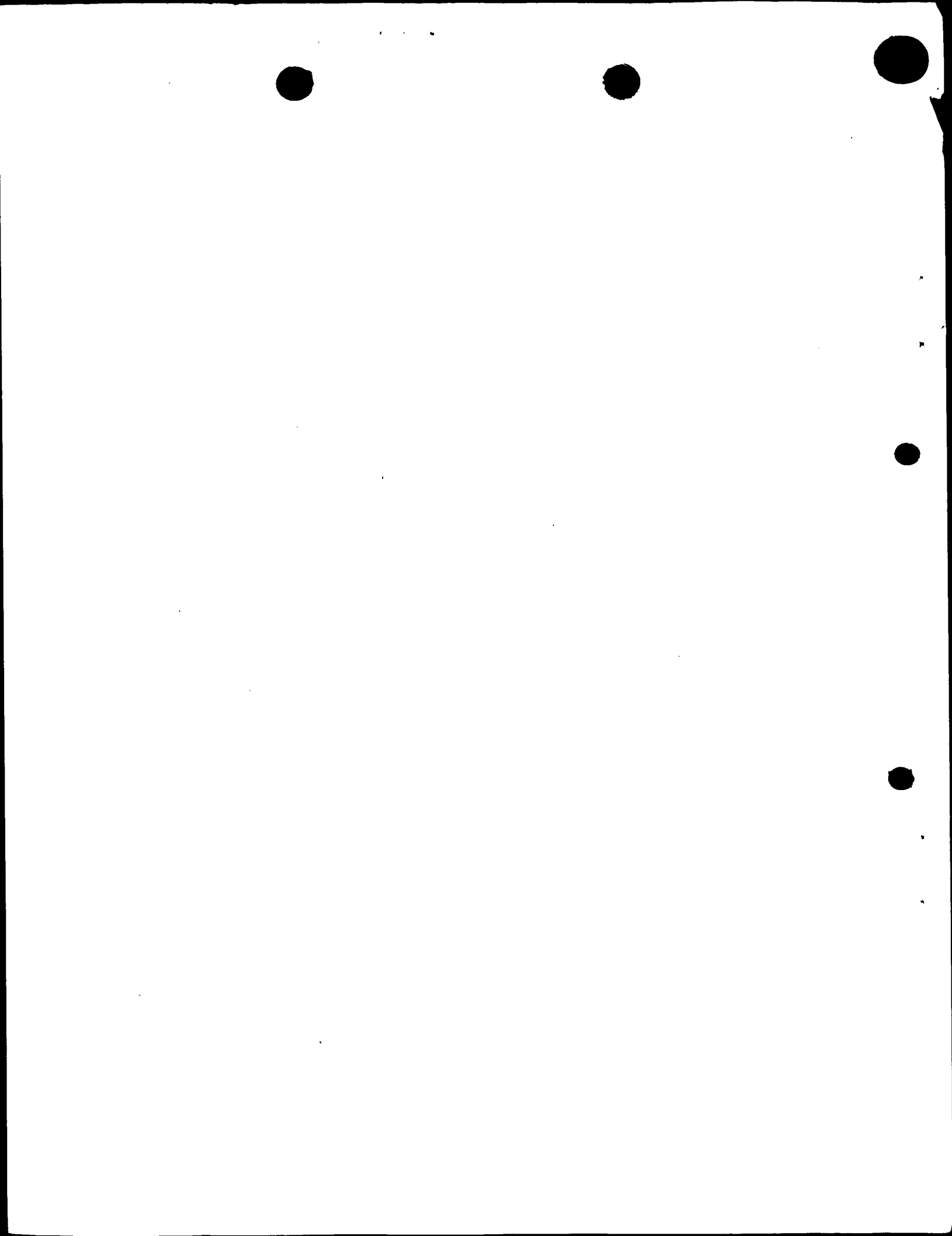
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

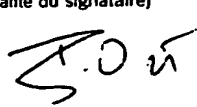



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis. rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

| | | | |
|--|--|---|--|
| Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES 14.05.99 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 99 06231- DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 DATE DE DÉPÔT 17 MAI 1999 | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone MJPCb539/87FR | |
| 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) PROMOTEUR DE LA THIOREDOXINE TaTrxh2 DE BLE | | 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 147, rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 Forme juridique Etablissement public Pays FRANCE | |
| 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/> Si la réponse est non, fournir une désignation séparée | | | |
| 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission | | | |
| 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande | | | |
| 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date | | | |
| 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) Béatrice ORES (N° 92-4046) | | SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI   | |

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

MJPcb539/87FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 06 231

TITRE DE L'INVENTION :

PROMOTEUR DE LA THIOREDOXINE TaTrxh2 DE BLE

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES
6, avenue de Messine
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- GAUTIER Marie-Françoise
16, rue Cyrano de Bergerac
34090 MONTPELLIER, FRANCE
- IHORAI Tania
115, rue de Nohanent
63100 CLERMONT-FERRAND, FRANCE
- JOUDRIER Philippe
60, rue Jeanne Garnerin
34070 MONTPELLIER, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) ~~du demandeur~~ du mandataire

Paris, le 17 mai 1999



Béatrice ORES (n° 92-4046)

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

| PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN | | | R.M.* | DATE DE LA CORRESPONDANCE | TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR |
|--|--------------|------------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Modifiée(s) | Supprimée(s) | Ajoutée(s) | | | |
| 127, 28 | | | X | 7/9/99 | J P M - 04 OCT. 1999 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROMOTEUR DE LA THIORÉDOXINE TaTrxh2 DE BLE

L'invention est relative au clonage et à la caractérisation d'un promoteur de thiorédoxine de blé.

Les thiorédoxines sont des protéines de faible
5 poids moléculaire, qui ont été mises en évidence chez un grand nombre d'organismes, où elles catalysent différentes réactions d'oxydoréduction impliquant des échanges dithiolsulfhydryles. Leur site catalytique comprend la séquence conservée : -Trp-Cys-Gly/Pro/Ala-
10 Pro-Cys-. Les thiorédoxines sous forme oxydée comprennent un pont disulfure, dont la réduction en groupes -SH, par la ferrédoxine réduite ou par le NADPH, est catalysée par l'intermédiaire d'un système spécifique.

Chez les plantes, on a mis en évidence 3 types
15 de thiorédoxine : les 2 premières (thiorédoxines m et f), sont des thiorédoxines ferrédoxine-dépendantes, localisées dans les chloroplastes, où elles interviennent dans la régulation de la photosynthèse. Un troisième type, dénommé thiorédoxine h, a été mis en évidence dans
20 le cytosol. La thiorédoxine h fait partie d'un système thiorédoxine NADP-dépendant (NTS), où elle est associée au NADPH et à une enzyme dénommée NADP-thiorédoxine réductase (NTR).

Initialement, 2 thiorédoxines h ont été
25 extraites et partiellement purifiées à partir du grain de blé (VOGT et FOLLMANN, Biochem. Biophys. Acta 873, 415-418, 1986). Récemment, l'équipe des Inventeurs a isolé et caractérisé 2 clones d'ADNc codant une thiorédoxine h de blé tendre (TaTrxh1), et une thiorédoxine h de blé dur
30 (TdTrxh1) (GAUTIER et al., Eur. J. Biochem. 252, 314-324, 1998). Les structures primaires déduites des clones d'ADNc des thiorédoxines h TaTrxh1 et TdTrxh1 sont très conservées (96% d'identité entre elles). Elles possèdent une extension N-terminale très riche en résidus Ala, dont
35 l'analyse révèle un domaine transmembranaire putatif de 20 résidus. Elles présentent de fortes homologues avec

les thiorédoxines h de céréales (70 à 80%) et les thiorédoxines h de dicotylédones (60%).

Les thiorédoxines h interviennent au cours de la germination du grain de blé, où elles participent, au
 5 niveau de l'albumen, à la mobilisation des réserves nécessaires à la croissance de l'embryon. Elles agissent notamment :

- en réduisant les ponts disulfure de certaines protéines de réserve, telles que les gliadines
 10 et les gluténines (KOBREHEL et al., Plant Physiol. 99, 919-924, 1992), ce qui augmente leur sensibilité à la protéolyse ;

- en réduisant des enzymes impliquées dans la mobilisation des réserves, ou des inhibiteurs de ces
 15 enzymes, ce qui entraîne l'activation des premières, et la désactivation des seconds.

Il a également été proposé d'utiliser les thiorédoxines h pour améliorer la qualité d'aliments, notamment à base de céréales ; il a en effet été constaté
 20 qu'elles favorisaient la formation de la pâte lors de la fabrication du pain (WONG et al., Cereal Chem. 70, 113-114, 1993), et qu'en outre elles diminuaient l'allergénicité de certains aliments.

Les Inventeurs ont entrepris l'étude de l'expression des thiorédoxines h dans les graines de
 25 céréales, notamment dans le blé, afin de fournir des moyens de contrôle de cette expression.

Dans le cadre de ces travaux, ils ont isolé un gène dénommé ci-après *TaTrxh2*, codant une thiorédoxine h
 30 de blé tendre (*Triticum aestivum*), dénommée ci-après *TaTrxh2*, dont la structure primaire présente 97% de similarité avec celle de la thiorédoxine h *TaTrxh1* de blé tendre (GAUTIER et al., 1998, publication précitée).

Les Inventeurs ont également isolé le promoteur du gène *TaTrxh2*, et ont exprimé, chez le riz,
 35 le gène rapporteur *gus* sous contrôle de ce promoteur. Ils

ont ainsi observé que l'expression du gène rapporteur était localisée exclusivement dans le grain de riz et plus particulièrement dans l'albumen amylicé. Ils ont en outre mis en évidence des régions impliquées dans la
 5 régulation spatiale et temporelle de ce promoteur.

La séquence du gène *TaTrxh2* et de la région en 5' comprenant le promoteur sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1.

La présente invention a pour objet un
 10 promoteur constitué par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel spécifique du promoteur du gène *TaTrxh2*.

On entend par « promoteur » une séquence d'ADN double-brin comprenant au moins les séquences nécessaires
 15 à l'initiation de la transcription d'un gène, éventuellement associées à des séquences de contrôle en cis de ladite transcription ; on entend par : « domaine fonctionnel spécifique d'un promoteur », une séquence dudit promoteur comprenant un ou plusieurs motifs d'ADN
 20 intervenant dans l'initiation de la transcription, ou bien une séquence d'ADN double-brin constituant un domaine de régulation comprenant un ou plusieurs des motifs d'ADN intervenant dans le contrôle en cis de la transcription par ledit promoteur.

25 Des promoteurs conformes à l'invention peuvent comprendre en particulier :

a) le fragment d'acide nucléique représenté dans la liste de séquences en annexe par la séquence SEQ ID NO : 2, ainsi que sur la figure 1, et qui
 30 correspond à la région 5' non codante du gène *TaTrxh2* s'étendant de la position -1 à la position -1111 par rapport au codon d'initiation ATG, ou des portions dudit fragment, notamment :

* le fragment d'acide nucléique dont la
 35 séquence s'étend de la position -1 à la position -83 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment

comprend les séquences intervenant dans l'initiation de la transcription, et nécessaires à l'activité de base du promoteur ;

* des fragments d'acide nucléique comprenant
5 des domaines fonctionnels intervenant dans la régulation de la transcription du gène *TaTrxh2*, et en particulier dans sa spécificité tissulaire et/ou dans son expression à différents stades du développement de la plante ; il s'agit en particulier :

10 - du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -591 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend un domaine de régulation intervenant dans l'inhibition de l'expression du gène *TaTrxh2* dans
15 l'épithélium du scutellum ;

- du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -228 à la position -451 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend un domaine de régulation intervenant dans
20 l'induction de l'expression du gène *TaTrxh2* en début de maturation du grain ;

- du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend un
25 domaine de régulation intervenant dans l'induction de l'expression du gène *TaTrxh2* dans l'épithélium du scutellum ;

- du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -83 à la position -228
30 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend des séquences intervenant dans l'induction de l'expression au niveau de l'albumen amylicé.

b) du fragment d'acide nucléique constituant le premier intron (positions 1232-2203 sur la séquence
35 SEQ ID NO: 1) du gène *TaTrxh2* ; ce fragment pourrait comprendre un domaine de régulation de type

amplificateur, augmentant le niveau d'expression du gène *TaTrxh2*.

L'homme du métier peut, à partir des fragments comprenant au moins un domaine fonctionnel du promoteur du gène *TaTrxh2* spécifiés ci-dessus, identifier plus
5 précisément les limites de ces domaines fonctionnels, ainsi que les motifs d'ADN impliqués dans la fonction de chacun d'entre eux, par des techniques connues en elles-mêmes, par exemple par la technique des empreintes sur
10 l'ADN (footprints), en incubant ces fragments avec des extraits nucléaires de cellules de l'albumen du grain, ainsi qu'avec des extraits nucléaires de cellules dans lesquels le promoteur du gène *TaTrxh2* est inactif.

L'invention englobe en particulier tout
15 promoteur pouvant être obtenu à partir d'un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel du promoteur du gène *TaTrxh2*, par les techniques classiques du génie génétique, notamment par mutagénèse et/ou recombinaison génétique. Il est ainsi
20 possible de produire des promoteurs artificiels possédant le niveau d'activité, et le degré de spécificité souhaité.

On peut ainsi par exemple inactiver un ou plusieurs des domaines fonctionnels de régulation
25 localisés dans la région 5' non codante du gène *TaTrxh2*, par exemple en procédant à la délétion d'au moins un nucléotide ou d'une séquence de nucléotides des motifs d'ADN impliqués dans la fonction du ou des domaines concernés. On peut également associer les molécules
30 d'acide nucléique comprenant des domaines fonctionnels du promoteur du gène *TaTrxh2* entre elles, et/ou avec des domaines fonctionnels provenant de promoteurs autres que celui du gène *TaTrxh2*.

L'invention englobe également :

35 - les cassettes d'expression, comprenant, outre un promoteur conforme à l'invention, un gène

d'intérêt placé sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, ou un site permettant l'insertion dudit gène d'intérêt ;

- les vecteurs recombinants, résultant de l'insertion d'un promoteur ou d'une cassette d'expression conformes à l'invention dans un vecteur hôte.

Les promoteurs conformes à la présente invention peuvent être utilisés pour contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans des cellules de plantes, notamment de monocotylédones.

Ledit gène d'intérêt peut par exemple être soit le gène *TaTrxh2*, placé sous contrôle d'un promoteur artificiel, tel que défini ci-dessus, dérivé du promoteur *TaTrxh2*, soit un gène hétérologue codant une thiorédoxine autre que *TaTrxh2*, ou toute autre protéine d'intérêt.

On peut par exemple introduire un gène d'intérêt sous contrôle du promoteur du gène *TaTrxh2*, ou d'un promoteur artificiel construit à partir des éléments de régulation de celui-ci qui confèrent la spécificité d'expression dans les cellules de l'albumen, afin d'exprimer ledit gène d'intérêt uniquement dans les cellules de l'albumen du grain. On peut également procéder à la délétion sélective des séquences du promoteur du gène *TaTrxh2* responsables de la spécificité d'expression, afin de construire un promoteur artificiel permettant d'assurer une expression ubiquitaire d'une thiorédoxine h, ou d'une autre protéine d'intérêt.

L'invention a en outre pour objet des cellules végétales et des plantes transgéniques, en particulier des monocotylédones, et notamment des céréales, transformées par au moins une molécule d'acide nucléique comprenant un promoteur conforme à l'invention.

Les Inventeurs ont ainsi obtenu des riz transgéniques, dans lesquelles un gène hétérologue a été placé sous contrôle transcriptionnel du promoteur du gène

TaTrxh2 et ont observé chez ces plantes une expression spécifique dans les cellules de l'albumen du grain.

Les cellules transformées et les plantes transgéniques conformes à l'invention sont également utilisables comme modèles pour étudier et/ou modifier l'expression de différents gènes dans les cellules de l'albumen du grain.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant le clonage et la caractérisation du gène *TaTrxh2* et de son promoteur.

EXEMPLE 1 : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DU GÈNE *TaTrxh2*

1.- Criblage d'une banque d'ADN génomique de blé

Une banque d'ADN génomique a été réalisée à partir de l'ADN extrait de feuilles de blé tendre (*Triticum aestivum*) de la variété Andain. Après digestion partielle de l'ADN génomique par *MboI*, les fragments de taille moyenne 15 kb ont été clonés au site *BamHI* du phage EMBL3 SP6/T7, qui a été propagé dans la bactérie hôte K802 -K 802 (*galK2*, *galT22*, *HsdR2*, (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *mcrA*⁻, *mcrB*⁻, *metB1*, *mrr*⁺, *supE44*).

6.10⁶ clones de la banque d'ADN génomique ont été étalés et criblés avec une sonde de 669 pb (TRX) contenant la totalité de la séquence codant la thiorédoxine h de blé tendre *TaTrxh1* (GAUTIER et al., 1998, publication précitée), et les clones positifs ont ensuite été criblés par ACP (amplification en chaîne par polymérase) à l'aide d'un couple d'amorces (THP2 et THM2) dérivées de la même séquence.

L'un des clones sélectionnés (λ 4), qui contient un fragment d'ADN génomique de blé de 10 kb environ, a été digéré par *PstI*, libérant deux fragments, l'un de 1,5 kb et l'autre de 3,8 kb, tous les deux reconnus par la sonde TRX. Ces deux fragments ont été

clonés dans le vecteur pLITMUS 29 (BIOLAB) au site de restriction *PstI*. Les deux clones obtenus sont dénommés CTRX3 et CTRX4. Le clone CTRX3 correspond au fragment de 1,5 kb et le clone CTRX4 au fragment de 3,8 kb.

5 L'analyse des séquences nucléotidiques des clones CTRX4 et CTRX3 montre qu'ils contiennent chacun une partie d'un même gène codant une thiorédoxine h de blé, tronqué lors de la digestion par *PstI*.

10 A partir des séquences nucléotidiques de ces 2 clones, les Inventeurs ont choisi deux amorces (THP8 et THM8) permettant d'amplifier un gène de thiorédoxine h sur une longueur d'environ 2,6 kb. L'ACP a été réalisée sur l'ADN non digéré du clone λ 4, et un fragment de la taille attendue a été cloné dans le vecteur pGEM-T
15 (PROMEGA). Le clone obtenu contient le gène *TaTrxh2* codant une thiorédoxine h de blé tendre.

Il comprend une région promotrice de 1111 pb, une région codante de 1447 pb, et une région 3' non codante de 131 pb.

20 La région codante du gène *TaTrxh2* comprend trois exons de 120, 123 et 135 pb séparés par deux introns, de 972 pb et de 93 pb. Le premier exon code un polypeptide de 40 acides aminés, le deuxième exon code un polypeptide de 41 acides aminés contenant le site actif,
25 et le troisième exon code un polypeptide de 45 acides aminés.

La séquence nucléotidique du gène *TaTrxh2* code une thiorédoxine h de blé tendre, nommée *TaTrxh2*, de 126 acides aminés, de masse moléculaire calculée 13435 Da
30 et de pI calculé 5,0.

La comparaison des séquences des produits de traduction du gène *TaTrxh2* et des gènes *TaTrxh1* précédemment décrite par GAUTIER et al. (1998, publication précitée) et *TdTrxh1* (thiorédoxine h de blé
35 dur) montre qu'elles sont très conservées. En effet, la séquence peptidique de *TaTrxh2* présente 97% de similarité

et 94% d'identité avec celle de TaTrxh1 et 95% de similarité et 90% d'identité avec celle de TdTrxh1.

Le domaine N-terminal de TaTrxh2 est plus court que celui de TaTrxh1 et TdTrxh1. La structure
 5 primaire de TaTrxh2 ne contient pas de peptide signal, suggérant que la protéine est localisée dans le cytoplasme. Cependant, elle présente une extension N-terminale déjà mise en évidence dans la structure
 10 primaire de TaTrxh1 et TdTrxh1, pouvant correspondre à un domaine transmembranaire. L'analyse de l'extension N-terminale de TaTrxh2 avec le programme RAO ARGOS (PC/gene, RAO et al., Biochem. Biophys. Acta 869, 197-214, 1986) révèle un domaine transmembranaire putatif
 15 entre les résidus 2 et 19. Le site actif, formé des 5 acides aminés suivants : WCGPC, est conservé entre les 3 thiorédoxines h de blé TaTrxh2, TaTrxh1 et TdTrxh1.

Les introns ont des tailles différentes de celles des introns des gènes de thiorédoxines h de blé précédemment mis en évidence par ROBERT (1994) indiquant
 20 que le gène TaTrxh2 est différent de ceux-ci. Les introns du gène TaTrxh2 sont du type 0 et sont limités en 5' par la séquence GTA et en 3' par la séquence CAG, qui correspondent à des séquences consensus des limites intron-exon.

25 La région 3' non codante du gène TaTrxh2 présente le signal de polyadénylation AATAAA commun aux gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

EXEMPLE 2 : ANALYSE STRUCTURELLE DU PROMOTEUR DU GÈNE TaTrxh2

30 Le promoteur du gène TaTrxh2 a été analysé pour rechercher des motifs de régulation putatifs susceptibles d'intervenir dans le contrôle de l'expression, et a notamment été comparé à celui des gènes de thiorédoxines h de *C. reinhardtii* (STEIN et al.,
 35 Plant Mol. Biol. 28, 487-503, 1995), de tabac (BRUGIDOU et al., Mol. Gen. Genet 238, 285-293, 1993) et de riz

(ISHIWATARI et al., 1995), de la thiorédoxine m de *C. reinhardtii* (STEIN et al., 1995), et des thiorédoxines murine (MATSUI et al., Gene 152, 165-171, 1995) et humaine (TONISSEN et al., Gene 102, 221-228, 1992 ;
 5 KAGHAD et al., Gene 140, 6643-6653, 1994).

La séquence du promoteur du gène *TaTrxh2* est représentée sur la figure 1.

Le site d'initiation de la transcription (représenté sur la figure 1 en gras et souligné d'un
 10 double trait) est une adénine située à -65 pb de l'ATG.

Le promoteur du gène *TaTrxh2* ne contient aucune séquence consensus correspondant à une boîte TATAN ou à une boîte CAAT aux positions attendues pour les gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

15 En revanche, il contient une boîte TATA-like (AATTTAT, soulignée d'un double trait sur la figure 1) à -105 pb de l'ATG.

Il contient également une boîte GC (GGGCCGGG, soulignée en pointillés sur la figure 1) située à -84 pb
 20 de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Les boîtes GC sont reconnues par des facteurs de transcription de type Sp1 (DYNAN et al. Nature 316, 774-778, 1985), et interviennent dans l'expression constitutive des gènes. Des boîtes GC sont présentes dans tous les promoteurs connus de gènes de
 25 thiorédoxines.

Une séquence riche en adénine, interrompue par un résidu G (AAAAAAAGAAAAAAA, en caractères gras soulignés d'un trait simple sur la figure 1), est située
 30 à -227 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2* ; des séquences de ce type ont également été identifiées précédemment dans les promoteurs des gènes de thiorédoxine h de tabac et de riz.

Des séquences *bHLH* (CANNTG), reconnues par des facteurs de transcription de la famille
 35 hélice/boucle/hélice, sont localisées à -206 pb et

-411 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2* ; elles sont représentées sur la figure 1 en lettres minuscules.

Des séquences *bzip* (ACGT, soulignées d'un trait simple sur la figure 1) reconnues par des facteurs
 5 de transcription de la famille des fermetures éclair à leucine (bZIP), sont localisées à -251 pb et -184 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Les protéines bZIP ont été décrites dans l'activation de l'expression de gènes
 10 codant des protéines de réserve du grain. Des motifs ACGT, ont également été décrits dans des séquences consensus ABRE (ABA-responsive element) des promoteurs de gènes dont l'expression est régulée par l'acide abscissique (ABA) (MUNDY et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1406-1410, 1990).

15 Deux boîtes pyrimidine (CCTTTCTCT et TCTTTCTTC, encadrées sur la figure 1) sont respectivement localisées à -553 pb et -541 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Les boîtes pyrimidine (CCTTTT) interviennent dans la
 20 régulation de l'expression par l'acide gibérellique, généralement en association avec des séquences GARE (GA-responsive element) (TAACAAA) (HUANG et al., Plant Mol. Biol. 14, 115-121, 1990), et des séquences O2S (opaque-2-binding sequence) ou boîte I (TATCCAT) (GUBLER et al., Plant Cell 4, 1435-1441, 1992 ; LANAHAN et al., Plant
 25 Cell, 4, 203-211, 1992), avec lesquelles elles s'organisent en un complexe appelé GARC (GA-responsive complex) (BETHKE et al., Bot. 48, 1337-1356, 1997). Aucune séquence GARE ou O2S n'a été mise en évidence dans les 1111 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*.

30 Un motif TGTGTGAGCA (en caractères gras, et souligné d'un trait en pointillés sur la figure 1) est situé à -403 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Ce motif ne diffère que par la présence d'un résidu G supplémentaire, de la séquence consensus « GCN4-like » (TGTGTGACA) de la
 35 « boîte albumen » impliquée dans l'expression albumen-spécifique de gènes de gluténines de blé (HAMMOND-KOSACK

et al., EMBO J. 12, 545-554, 1993). Cependant, l'autre motif de la boîte albumen, dénommé EM (TGTAAGT), et dont la présence est également nécessaire pour l'expression albumen-spécifique (ALBANI et al., Plant Cell 9, 171-184, 1997), n'a pas été mis en évidence dans les 1111 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*.

Des diades trimériques CAA et TTG (en italique sur la figure 1) séparées par 10 bases, sont présentes respectivement à -107 pb et -97 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Ces motifs sont associés à une expression spécifique dans la couche à aleurone (THOMAS et al., Plant Cell 2, 1171-1180, 1990).

EXEMPLE 3 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU PROMOTEUR DU GÈNE *TaTrxh2*.

La séquence de 1111 pb en 5' de l'ATG du gène *TaTrxh2*, ou différents fragments de cette séquence ont été clonés en amont de la séquence codante du gène rapporteur *gus* dans le vecteur pSPORT1-GUS. Le vecteur pSPORT1-GUS (DIGEON, 1997) contient la séquence codante du gène *gus* (β -glucuronidase d'*E. coli*) et le terminateur *nos-ter* du gène de la nopaline synthase, insérés au site EcoRI-HindIII du vecteur pSPORT1 (GIBCO BRL).

Les constructions réalisées sont les suivantes :

- P1 : cette construction comprend la totalité de la séquence de 1111 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;
- P2 : cette construction comprend la séquence de 589 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;
- P3 : cette construction comprend la séquence de 481 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;
- P4 : cette construction comprend la séquence de 228 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;
- P5 : cette construction comprend la séquence de 83 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*.

Les limites des régions du promoteur du gène *TaTrxh2* utilisées dans les constructions sont indiquées sur la figure 1.

A titre de témoin positif, on a utilisé le
 5 vecteur pUGCl (CHAÏR et al., 1996), qui permet l'expression constitutive et ubiquitaire du gène *gus* sous le contrôle du promoteur, du premier exon et du premier intron du gène codant l'ubiquitine du maïs.

Le vecteur pSPORT1-GUS a été utilisé comme
 10 contrôle négatif.

Ces différentes constructions ont été transférées par bombardement selon le protocole décrit par FAUQUET et al. (Proc. Third. Int. Rice Genet. Symp., Ed. G.S. Khush, 153-165, 1996), dans de jeunes cals
 15 embryogènes de riz (var. japonica IRAT 349) dérivant de la prolifération du scutellum de l'embryon mature. Toutes les constructions testées ont été co-transférées avec le vecteur pILTAB227 (FAUQUET et al., 1997), qui confère la résistance à l'hygromycine et qui permet la sélection des
 20 cellules transformées.

Un mélange du vecteur portant la construction à tester, et du vecteur pILTAB227 (rapport molaire : vecteur à tester/pILTAB227 = 4/1) est utilisé pour enrober des microparticules d'or, à raison de 5 µg d'ADN
 25 total (3 µg d'ADN à tester + 2 µg de pILTAB227) à une concentration de 1 µg/µl, pour 3 mg d'un mélange en quantité égale de microparticules d'or de diamètres 1,0 µm et 1,6 µm, en suspension dans 50 µl d'eau distillée.

30 Le bombardement est effectué à l'aide d'un canon à particules PDS-1000/He (PARTICULE DELIVERY SYSTEM, BIORAD).

Les cals embryogènes bombardés sont ensuite criblés sur un milieu de sélection contenant de
 35 l'hygromycine. Les cals résistants à l'hygromycine sont sélectionnés et placés sur milieu de régénération

dépourvu d'hygromycine. Les plants régénérés (génération F0) ont ensuite été transférés dans des pots, et, après acclimatation en phytotron, sont cultivés en serre.

L'expression du gène *gus* a été recherchée dans les organes végétatifs et dans les graines des riz des générations T0 et T1. Seules les plantes fertiles et présentant un phénotype normal, ont été retenues pour l'analyse. L'intégration du transgène dans les plantes analysées a été vérifiée par ACP et transfert de Southern.

La détection de l'activité β -glucuronidase a été effectuée par test histochimique, en détectant la coloration bleue résultant de l'hydrolyse de l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronique (X-GLU), et sa quantification a été effectuée par test fluorométrique, en mesurant la 4-méthylumbelliférone (MU) formée à partir d'acide 4-méthylumbelliréfyl β -glucuronique, selon les protocoles décrits par JEFFERSON et al. (Plant Mol. Biol. Report 5, 387-405, 1987).

20 1. Expression du gène *gus* dans les organes végétatifs

L'analyse a été effectuée sur les racines, les chaumes, et les feuilles.

Dans le cas des plants de riz non-transformés, ou de ceux transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS, l'analyse histochimique ne révèle pas d'activité GUS, et les mesures fluorimétriques ne font apparaître qu'une activité très faible voire nulle.

Dans le cas des plants de riz transformés avec le vecteur pUGCI, on observe une activité GUS élevée (supérieure à 500 pmol MU/min/mg de protéine) dans tous les organes végétatifs testés.

Dans le cas des plants de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5, on n'observe aucune coloration dans les organes végétatifs incubés en présence de X-GLU, et l'activité GUS mesurée par fluorométrie n'est pas significativement différente de

celles mesurée pour les plantes transformées avec le vecteur pSPORT1-GUS ou les plantes non transformées. Ces résultats montrent que le promoteur du gène *TaTrxh2* ne permet pas l'expression du gène *gus* dans les organes
 5 végétatifs.

2. Expression du gène *gus* dans les grains

Analyse histochimique

Au niveau des grains entiers

Les grains de riz, prélevés à 35 JAF (jours
 10 après fécondation) ont été coupés dans le sens longitudinal puis incubés en présence de X-GLU.

Aucune coloration n'est détectée dans les grains de riz transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS.

On détecte au contraire une coloration intense
 15 de la totalité du grain pour les grains de riz transformés avec le vecteur pUGC1.

Dans le cas des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4, une coloration bleue est détectée dans l'albumen des grains, mais pas dans
 20 l'embryon (axe cotylédonaire et scutellum), les enveloppes ou les épilletts. Au niveau de l'albumen, cette coloration apparaît notamment à la périphérie de l'embryon, au dessus de l'épithélium du scutellum, et dans une zone médiane de l'albumen sur toute la longueur
 25 du grain.

Cette coloration est moins intense, et apparaît moins rapidement que celle observée dans les grains de riz transformés avec pUGC1. L'intensité de la coloration semble varier selon la construction (P1, P2, P3 ou P4) concernée. L'intensité la plus élevée est observée dans les grains de riz transformés avec la construction P2, et la plus faible dans ceux transformés avec la construction P4. Ces résultats sont confirmés par l'analyse des grains T1, où la coloration apparaît plus
 30 rapidement que dans les grains T0 et est plus intense.
 35

Dans le cas des grains de riz transformés avec la construction P5, aucune coloration n'est détectée, ni dans l'embryon, ni dans l'albumen, ni dans les enveloppes.

5 *Au niveau des différents tissus du grain*

Pour déterminer précisément la localisation de l'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur du gène *TaTrxh2*, des coupes histologiques ont été réalisées et observées au microscope photonique.

10 Ces observations montrent que, pour les constructions P1, P2, P3 ou P4, le marquage est localisé dans un petit nombre de cellules de l'albumen amylacé situées à la périphérie de l'embryon et dans la zone centrale de l'albumen amylacé. Les cellules de l'embryon,
15 de la couche à aleurone et des enveloppes, ne sont pas marquées. Pour la construction P5, aucun marquage n'est visible.

Analyse fluorimétrique

20 L'activité GUS a été mesurée d'une part sur les embryons et d'autre part sur l'albumen des grains de riz.

L'activité GUS est nulle ou très faible dans les grains de riz transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS, comme dans les grains de riz non-transformés. En
25 revanche, elle est très forte (>500 pmol/MU/min/mg de protéine) dans l'embryon et l'albumen des grains de riz transformés avec le vecteur pUGC1.

L'activité GUS mesurée dans les embryons des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2
30 P3, P4 ou P5 n'est pas significativement différente de celle mesurée dans les grains de riz non-transformés ou de riz transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS.

En revanche, l'activité mesurée dans l'albumen des grains de riz transformés avec les constructions P1,
35 P2, P3 ou P4, est 25 à 40 fois plus élevée que celle mesurée dans l'albumen des grains de riz non-transformés

ou transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS. Elle varie de 40 pmol/MU/min/mg de protéine pour les grains de riz transformés avec la construction P2, à 25 pmol/MU/min/mg de protéine pour ceux transformés avec la construction P4. Pour la construction P5, aucune activité GUS n'est détectée dans les grains.

Ces résultats montrent que la région (-1111 pb à -83 pb) du promoteur du gène *TaTrxh2* permet l'expression du gène *gus* uniquement dans les cellules de l'albumen amyloacé, et que seule la délétion ne laissant subsister que 83 pb en amont de l'ATG a supprimé les séquences responsables de l'expression spatiale, dont certaines sont probablement localisées dans la région du promoteur comprise entre -228 pb et -83 pb.

Le motif GCN4-like identifié lors de l'analyse de la structure du promoteur du gène *TaTrxh2* n'est donc apparemment pas le seul responsable de la spécificité tissulaire de l'expression ; en effet, malgré sa délétion dans les constructions P3 et P4, l'expression du gène *gus* demeure spécifique de l'albumen du grain.

Deux séquences : AACAAATCC, et AACAAAGTG (représentées en caractères gras sur la figure 1), sont respectivement présentes à -51 pb et -381 pb par rapport à l'ATG du gène *TaTrxh2*. Ces séquences présentent une similitude avec des motifs AACA (AACAAACTCTATC) récemment mis en évidence dans les promoteurs de 6 gènes codant des glutélines de riz, et intervenant dans l'expression albumen-spécifique de ces gènes.

EXEMPLE 4 : EVOLUTION DE L'EXPRESSION DU GÈNE GUS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES GRAINS DES RIZ TRANSGÉNIQUES

L'expression du gène *gus* a été suivie au cours de la maturation et de la germination de grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5.

1. Au cours de la maturation

Trois stades ont été analysés : 10 JAF, 25 JAF et 35 JAF. L'expression du gène *gus* a été évaluée, soit

par localisation histochimique de l'activité GUS, soit par détection des transcrits par transfert de Northern.

Activité GUS

5 L'analyse histochimique montre que pour les trois stades de maturation étudiés, 10, 25, et 35 JAF, une activité GUS est toujours détectée dans l'albumen amylicé des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4. Par contre pour la construction P5, aucune activité GUS n'est détectée.

10 A 10 JAF, l'activité GUS est détectée dans l'albumen amylicé, à la périphérie de l'embryon. A 25 JAF, l'activité GUS progresse vers la zone médiane de l'albumen amylicé. A 35 JAF, l'activité GUS est détectée sur toute la surface de l'albumen amylicé.

15 L'intensité de la coloration varie avec la nature de la construction et le stade de maturation, en particulier dans le cas de la construction P4, pour laquelle la coloration est très difficile à détecter en début de maturation.

20 Ces résultats sont confirmés par les observations plus détaillées au niveau de chaque tissu du grain, qui montrent que :

- A 10 JAF : pour les constructions P1, P2 ou P3, l'activité GUS est très forte dans les cellules de l'albumen amylicé à la périphérie de l'embryon, et elle n'est pas détectée dans les cellules de la zone médiane de l'albumen amylicé. Pour la construction P4, l'activité GUS dans les cellules de l'albumen amylicé est très faible, voire non détectable. En outre, dans les grains de riz transformés avec la construction P2, une activité GUS est également détectée dans les cellules de l'épithélium du scutellum.

35 - A 25 JAF : pour les constructions P1, P2 ou P3, l'activité GUS a diminué dans les cellules de l'albumen amylicé à la périphérie de l'embryon et augmente dans celles de la zone centrale de l'albumen

amylacé ; pour les grains de riz transformés avec la construction P2, on ne détecte plus d'activité GUS dans les cellules de l'épithélium du scutellum. Dans les grains de riz transformés avec la construction P4, l'activité GUS a augmenté dans les cellules de l'albumen amylacé situées à la périphérie de l'embryon et dans la zone centrale.

- A 35 JAF : l'activité GUS est beaucoup plus faible qu'à 25 JAF dans toutes les cellules de l'albumen amylacé des grains de riz transformés avec P1, P2 ou P3 ; dans les grains de riz transformés avec la construction P4, l'activité GUS est détectée dans les cellules de la zone médiane de l'albumen amylacé.

Pour la construction P5, aucune activité GUS n'est détectée quel que soit le stade de maturation ou le tissu du grain analysé.

Quelle que soit la construction utilisée, aucune activité GUS n'est détectée au cours de la maturation, dans les cellules de l'axe embryonnaire, de la couche à aleurone, ou des enveloppes des grains.

Détection des transcrits du gène *gus*

La présence des transcrits du gène *gus* a été recherchée dans les ARN totaux extraits, aux différents stades de maturation, des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5. La détection a été réalisée par transfert de Northern, en utilisant la sonde P3+GUS. Cette sonde de 2,6 kb comprend la séquence de 481 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*, la séquence codante du gène *gus* et le terminateur du gène *nos*.

Pour chacune des constructions P1, P2, P3, P4 ou P5, cette sonde permet de détecter la présence de transcrits dont la taille attendue est comprise entre 1,9 et 2,4 kb, selon la construction.

La présence de ces transcrits varie en fonction de la construction utilisée pour la transformation, et du stade de maturation.

Pour les riz transformés avec la construction P1, les transcrits sont détectés aux 3 stades de la maturation avec un maximum à mi-maturation.

5 Pour les riz transformés avec la construction P2, les transcrits sont détectés au début de la maturation.

Pour les riz transformés avec la construction P3, les transcrits sont détectés au début et à la fin de la maturation du grain.

10 Pour les riz transformés avec la construction P4, les transcrits sont détectés à mi-maturation et en fin de maturation du grain.

Pour les riz transformés avec la construction P5, aucun transcrit du gène *gus* n'est détecté quel que soit le stade de maturation analysé.

2. Au cours de la germination

Pour l'étude de l'expression du gène *gus* au cours de la germination, l'activité GUS a été analysée par histochimie dans des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5.

Pour chaque construction, 10 grains ont été mis à germer à l'obscurité et prélevés à différents temps après imbibition : 0, 12, 24, 48 et 72 heures.

25 L'activité GUS est détectée dans l'albumen amyloplaste des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4 quel que soit le stade de germination. Par contre pour les grains de riz transformés avec la construction P5 aucune activité GUS n'est détectée.

30 L'étude de l'accumulation des transcrits du gène *gus* dans les grains transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4 montre que ceux-ci ne sont pas accumulés au cours de la germination quelle que soit la construction.

35 Ces résultats indiquent que le promoteur (1111 pb en amont de l'ATG) du gène *TaTrxh2* ne permet pas

l'expression du gène *gus* au cours de la germination. L'activité GUS détectée dans les grains germés est certainement une activité résiduelle due à la très grande stabilité de la β -glucoronidase dans le grain.

5 Conclusion

L'analyse de l'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur du gène *TaTrxh2* au cours du développement des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5 met en évidence un effet des délétions du promoteur du gène *TaTrxh2* sur l'expression temporelle et spatiale du gène *gus* dans les grains des riz transformés.

Les constructions P1, P2, P3 permettent une expression du gène *gus* plus précoce que la construction P4 au cours de la maturation. La construction P5 ne permet pas l'expression du gène *gus* puisqu'aucun transcrit n'est détecté. En effet, des transcrits du gène *gus* sont détectés à 10 JAF pour les 3 constructions P1, P2, P3, et seulement 25 JAF pour la construction P4. Ceci suggère que les différences de niveau d'expression précédemment signalées entre les constructions P2 et P4, résultent probablement d'un retard dans l'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur P4, plutôt que d'un niveau d'expression plus faible. La région du promoteur du gène *TaTrxh2* comprise entre -1111 pb et -228 pb contient certainement des séquences de régulation qui permettent une expression du gène *gus* dans les premiers stades de la maturation.

Concernant l'expression spatiale, la région du promoteur du gène *TaTrxh2* comprise entre -1111 pb et -591 pb contient probablement une séquence inhibant l'expression du gène dans l'épithélium du scutellum. En effet, lorsqu'elle est délétée (construction P2) l'expression du gène *gus* est observée dans ce tissu. A l'inverse, la région comprise entre -591 pb et -451 pb contiendrait une séquence activant l'expression dans

l'épithélium du scutellum, car lorsqu'elle est délétée (construction P3) il n'y a plus d'expression du gène *gus* dans ce tissu.

5 Les résultats montrent qu'au cours de la maturation des grains de riz, le promoteur du gène *TaTrxh2* permet une expression du gène *gus* spécifique de l'albumen amylacé. Cette expression est détectée dans un nombre restreint de cellules réparties dans une zone centrale de l'albumen et à la périphérie de l'embryon.

10

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> INRA

<120> Promoteur du gène TaTrxh2

<130> MJPCb539/87

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2687

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> exon

<222> (1112)..(1231)

<220>

<221> intron

<222> (1232)..(2203)

<220>

<221> exon

<222> (2204)..(2326)

<220>

<221> intron

<222> (2327)..(2420)

<220>

<221> exon

<222> (2421)..(2558)

<220>

<221> CDS

<222> (1112)..(1231)

<220>

<221> CDS

<222> (2204)..(2326)

<220>

<221> CDS

<222> (2421)..(2558)

<400> 1

gaagtcagaa ggccgttcag aattgttggg ggactcgaaa aaaagaaggg gagcccaggc 60
 agacgacggg gcggcatgtg cctgttcctt ggcgaggcgt ctagcttttg cagccgccgc 120
 cgcttttctc cttgggtggg cgcgcgagct ccccgagttt gagccgcaat ttttttacat 180
 tttatggcga tggcgtcagg cgtttatcta ggcgtctggg aggttacatt tgaagatgtg 240
 ccaccaactc caaacggaca accctgtatc tgagcatgcc tcatgcctct ccttcatgcc 300

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|
| tcccaaacgt | ctcctcaagt | ttggcatagt | aagatcgatt | gtgctaactc | cactaaaaac | 1941 | | | | | | | | | | |
| actgtaccag | gaatttatat | gatgatcatc | ttgttgtttg | tatatatttt | tttgcggggg | 2001 | | | | | | | | | | |
| agtttataac | tttccgtgga | ttttcatctc | tgaaattgtg | gaacatcata | aaattccagt | 2061 | | | | | | | | | | |
| gctattctct | tcacgtgaat | tataacctgg | attgattgta | agctctggta | ggtgtttatg | 2121 | | | | | | | | | | |
| gtgttgaact | agcagtagca | ttattgaccc | atgctttgca | catttgtgtc | aaggtcctgt | 2181 | | | | | | | | | | |
| taaccttgtc | gtttgtaaca | g | gtg | gtg | ggt | gac | ttc | act | gca | tca | tgg | tgt | 2232 | | | |
| | | Val | Val | Val | Asp | Phe | Thr | Ala | Ser | Trp | Cys | 50 | | | | |
| | | | | | | 45 | | | | | | | | | | |
| gga | cca | tgc | cgc | atc | atg | gct | cca | ggt | ttc | gct | gat | ctc | gcc | aag | aag | 2280 |
| Gly | Pro | Cys | Arg | Ile | Met | Ala | Pro | Val | Phe | Ala | Asp | Leu | Ala | Lys | Lys | |
| | | | 55 | | | | | | 60 | | | | | 65 | | |
| ttc | cca | aat | gct | ggt | ttc | ctc | aag | gtc | gat | gtc | gat | gaa | ctg | aag | | 2325 |
| Phe | Pro | Asn | Ala | Val | Phe | Leu | Lys | Val | Asp | Val | Asp | Glu | Leu | Lys | | |
| | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | |
| gtaatggaac | cgatggcgct | gtttacagag | cacagagtat | catcgtgcga | tttcagagct | 2385 | | | | | | | | | | |
| gtgttactaa | caaggtttta | tgtttgtatga | acagcccatt | gcg | gag | caa | ttc | agc | | | | | | | | 2440 |
| | | | | | Glu | Gln | Phe | Ser | | | | | | | | 85 |
| gtt | gag | gcc | atg | cca | acc | ttc | ctg | ttc | att | aag | gaa | gga | gat | gtc | aag | 2488 |
| Val | Glu | Ala | Met | Pro | Thr | Phe | Leu | Phe | Ile | Lys | Glu | Gly | Asp | Val | Lys | |
| | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | 100 | | |
| gac | agg | gtt | gtg | gga | gct | atc | aag | gag | gaa | ctg | acg | aac | aag | gtt | ggg | 2536 |
| Asp | Arg | Val | Val | Gly | Ala | Ile | Lys | Glu | Glu | Leu | Thr | Asn | Lys | Val | Gly | |
| | | | 105 | | | | | 110 | | | | | 115 | | | |
| cta | cac | gcg | gcg | gcc | cag | taatcaccta | gcggagtagt | attcgcttaa | | | | | | | | 2584 |
| Leu | His | Ala | Ala | Ala | Gln | | | | | | | | | | | |
| | | | 120 | | | | | | | | | | | | | |
| ataaaattgt | ggctcaagaa | gcggtgcctc | taatggcacc | ttatatcctg | tgtactgctt | 2644 | | | | | | | | | | |
| gttacttggt | ggttggatga | tggtgaatca | agtgtgactt | tat | | 2687 | | | | | | | | | | |

```
<210> 2
<211> 1111
<212> ADN
<213> Triticum aestivum
```

```
<400> 2
gaagtcagaa ggccgttcag aattgttgga ggactcgaaa aaaagaaggg gagcccaggc 60
agacgacggg gcggcatgtg cctgttcctt ggcgaggcgt ctagctttgg cagccgccgc 120
cgctttttct cttgggtggg cgcgcgagct ccccgagttt gagccgcaat ttttttacat 180
tttatggcga tggcgtcagg cgtttatcta ggcgtctggg agggtagatt tgaagatgtg 240
ccaccaactc caaaccgaca accctgtatc tgagcatgcc tcatgcctct ccttcatgcc 300
```

tccctttggg tgaggtcatg tgcccttggc ggcgagtggc ttcccgttta gagcaagtat 360
aataagtcct agtcagctgg ctataagatg ttccacatca gcaaatacctt aaactggagg 420
agaaagaaag taggagttag aagggcgctg gcgcttcgtc aatcgctagc gatagcacia 480
gctcccatgg aatcgagcca acatgcaacc cgcacaatga ctaaaggcaa acgccagcca 540
atcagtatgc ctttctctgc atctttcttc atgcaagcat taaatactat agctaatacta 600
cagccagttt attatataaa caggctatat agctgacctg gcagtgtat agagccggca 660
gccggctctt ctattagctt tgctcttatg gctacatctg tgtgagcagt cgattgattc 720
aaacaacaaa tccgggctt cagcaagtcg gaatgaattt cggctcatca ctattgtcg 780
tgggcctcac gcgtattcgc ctaaccgtgt ttgaatcaga ccctcacgaa gccacggctc 840
cagcgacctg ttcaccacgt cagcctaaaa aaagaaaaaa aaactgttca atcacacgcc 900
catctgaacc gttcaacagc cccacgtaat ttcgcgcacc agcaaagggc atatccgtca 960
tagcgagcgc ataaattctg attcctgcct gcctgccgga caatttatct ttggggaggg 1020
gggccgggat tggagacaga gccacaagg caacaacaaa gtgcgcgtga gaaatcaaca 1080
agcggtgctt gccgagaaga gagagagaga g 1111

REVENDEICATIONS

1) Promoteur caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel spécifique du promoteur du gène *TaTrxh2*.

2) Promoteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit fragment d'acide nucléique est choisi dans le groupe constitué par :

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -1 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -1 à la position -228 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -591 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -228 à la position -451 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -83 à la position -228 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence est celle du premier intron du gène *TaTrxh2*.

3) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

4) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

5) Cellule végétale transformée par au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

6) Plante transgénique transformée par au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

7) Plante transgénique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une monocotylédone.

8) Utilisation d'un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2 pour contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule végétale.

REVENDICATIONS

1) Promoteur caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel spécifique du promoteur du gène *TaTrxh2*.
5

2) Promoteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit fragment d'acide nucléique est choisi dans le groupe constitué par :

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -1 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
10

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -1 à la position -83 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à la position -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
15

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -591 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
20

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -228 à la position -451 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
25

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -83 à la position -228 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence est celle du premier intron du gène *TaTrxh2*.
30

3) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

4) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

5) Cellule végétale transformée par au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

6) Plante transgénique transformée par au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

10 7) Plante transgénique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une monocotylédone.

15 8) Utilisation d'un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2 pour contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule végétale.

P1
 GAAGTCAGAAGGCCGTTTCTGAGGACTCGAAAAAAGAAGGGGAGCCAGGC 60
 AGACGACGGGGCGGCATGTGCCTGTTCTTGGCGAGGCGTCTAGCTTTGGCAGCCGCCGC 120
 CGCTTTTCTCCTTGGGTGGGCGCGGAGCTCCCCGAGTTTGAGCCGCAATTTTTTTACAT 180
 TTTATGGCGATGGCGTCAGGCGTTTATCTAGGCGTCTGGGAGGGTACATTTGAAGATGTG 240
 CCACCAACTCCAAACCGACAACCCTGTATCTGAGCATGCCTCATGCCTCTCCTTCATGCC 300
 TCCCTTTGGGTGAGGTCATGTGCCCTTGGCGGCGAGTGGCTTCCCGTTTAGAGCAAGTAT 360
 AATAAGTCCTAGTCAGCTGGCTATAAGATGTTCCACATCAGCAAATCCTTAAACTGGAGG 420
 P2
 AGAAAGAAAGTAGGAGTGAGAAGGGCGTCGGCGCTTCGTCAATCGCTAGCGATAGCACAA 480
 GCTCCCATGGAATCGAGCCAACATGCAACCCGCGACAATGACTAAAGGCAAACGCCAGCCA 540
 P3
 ATCAGTATGCTTTTCTCTGCATCTTTCTTCATGCAAGCATTAAATACTATAGCTAATCTA 600
 CAGCCAGTTTATTATATAAACAGGCTATATAGCTGACCTGGCAGTGCTATAGAGCCGGCA 660
 GCCGGCTCTTCTATTAGCTTTGCTCTTATGGCTACATCTGTGTGAGCAGTCGATTGATTC 720
 AAACAACAATCCGGGCGTTTCTGCAAGTCGGAATGAATTTCCGGCTCATCACTCATTGTCTG 780
 TGGGCCTCACGCGTATTCGCCTAACCGTGTTTGAATCAGACCCCTCACGAAGCCACGGCTC 840
 P4
 CAGCGACCCGTTTACCACGTCAGCCTAAAAAAGAAAAAACTGTTCAATCACACGCC 900
 catctgAACCGTTCAACAGCCCCACGTAATTTTCGCGCACCAGCAAAGGGCATATCCGTCA 960
 TAGCGAGCGCATAAATTCTGATTCTGCCTGCCTGCCGGACAATTTATCTTTGGGGAGGC 1020
 P5
 GGGCCGGGATTGGAGACAGAGCCCAAGGCAACAACAAGTGCGCGTGAGAAATCAACA 1080
 AGCGGTGCTTGCCGAGAAGAGAGAGAGAGAG 1111

FIG. 1